

PCT/JP 2004/011567

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

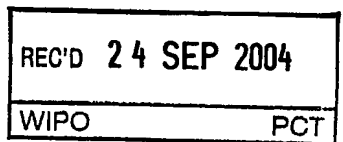
05. 8. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 3 年 8 月 7 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 2 8 8 8 5 9
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 2 8 8 8 5 9]



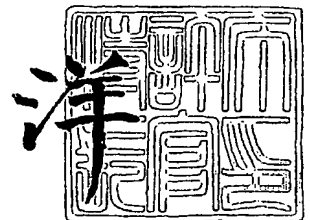
出 願 人
Applicant(s): 遠 藤 弥 重 太
澤 崎 達 也

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) Ok (b)

2 0 0 4 年 9 月 9 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

出 証 番 号 出 証 特 2 0 0 4 - 3 0 8 1 0 8 2

【書類名】 特許願
【整理番号】 03-1101
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 15/09
【発明者】
 【住所又は居所】 愛媛県松山市久万の台 4 7 8 - 1 7
 【氏名】 遠藤 弥重太
【発明者】
 【住所又は居所】 愛媛県松山市本町 3 - 1 - 8 - 7 0 1
 【氏名】 澤崎 達也
【特許出願人】
 【識別番号】 594016182
 【氏名又は名称】 遠藤 弥重太
【特許出願人】
 【識別番号】 503056643
 【氏名又は名称】 澤崎 達也
【代理人】
 【識別番号】 100088904
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 庄司 隆
 【電話番号】 03-3864-6572
【選任した代理人】
 【識別番号】 100124453
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 資延 由利子
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 067070
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲**【請求項 1】**

以下の要素を含む、無細胞タンパク質合成系を利用するタンパク質チップ試薬。

a: 胚乳成分及び低分子のタンパク質合成阻害物質が実質的に除去された小麦胚芽抽出物からなる無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有液が、複数の領域に区画された容器のそれぞれ異なるウェルに添加されている、

b: 少なくとも、基質及びエネルギー源を含むタンパク質合成に必要な物質、及び特定翻訳鋳型がaに記載のウェルに添加されている、

c: bに記載のウェル中の溶液が凍結乾燥により凍結乾燥剤化されている。

【請求項 2】

以下の要素を含む、無細胞タンパク質合成系を利用するタンパク質チップ試薬。

a: 胚乳成分及び低分子のタンパク質合成阻害物質が実質的に除去された小麦胚芽抽出物からなる無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有液が、複数の領域に区画された容器のそれぞれ異なるウェルに添加されている、

b: 少なくとも、基質及びエネルギー源を含むタンパク質合成に必要な物質、及び特定翻訳鋳型がaに記載のウェルに添加されている、

c: bに記載のウェル中の溶液が凍結乾燥により凍結乾燥剤化されている、

d: cに記載の凍結乾燥剤中の潮解性物質含有量が、該凍結乾燥製剤中のタンパク質 1 重量部に対して 0.01 重量部以下である。

【請求項 3】

以下の要素を含む、無細胞タンパク質合成系を利用するタンパク質チップ試薬。

a: 胚乳成分及び低分子のタンパク質合成阻害物質が実質的に除去された小麦胚芽抽出物からなる無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有液が、複数の領域に区画された容器のそれぞれ異なるウェルに添加されている、

b: 少なくとも、基質及びエネルギー源を含むタンパク質合成に必要な物質、及び特定翻訳鋳型がaに記載のウェルに添加されている、

c: bに記載のウェル中の溶液が凍結乾燥により凍結乾燥剤化されている、

d: cに記載の凍結乾燥剤中の潮解性物質含有量が、該凍結乾燥製剤中のタンパク質 1 重量部に対して 0.01 重量部以下である、

e: bに記載の翻訳鋳型が 2 種以上の翻訳鋳型を含み、複数の領域に区画された容器のそれぞれの異なるウェル内で 2 種以上のタンパク質を合成可能とする。

【請求項 4】

以下の要素を含む、無細胞タンパク質合成系を利用するタンパク質チップ試薬。

a: 胚乳成分及び低分子のタンパク質合成阻害物質が実質的に除去された小麦胚芽抽出物からなる無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有液が、複数の領域に区画された容器のそれぞれ異なるウェルに添加されている、

b: 少なくとも、基質及びエネルギー源を含むタンパク質合成に必要な物質、及び特定翻訳鋳型がaに記載のウェルに添加されている、

c: bに記載のウェル中の溶液が凍結乾燥により凍結乾燥剤化されている、

d: cに記載の凍結乾燥剤中の潮解性物質含有量が、該凍結乾燥製剤中のタンパク質 1 重量部に対して 0.01 重量部以下である、

e: bに記載の翻訳鋳型が 2 種以上の翻訳鋳型を含み、複数の領域に区画された容器のそれぞれの異なるウェル内で 2 種以上のタンパク質を合成可能とする。

f: 翻訳鋳型から合成されるタンパク質が固定化用修飾を受けており、かつウェル内表面及び／又はウェル中の担体に該固定化用修飾により付加される物質と親和性を有する物質がコーティングされている。

【請求項 5】

固定化用修飾が、アビジン化、ビオチン化、ストレプトアビジン化、His タグ化から少なくとも 1 つが選択される請求項 4 に記載の無細胞タンパク質合成系を利用するタンパク質チップ試薬。

【請求項 6】

請求項 1 ～ 5 の何れかに記載の無細胞タンパク質合成系を利用するタンパク質チップ試薬を含む無細胞タンパク質合成用キット。

【請求項 7】

請求項 1 ～ 5 の何れかに記載の試薬を用いた、以下の要素を含む特定翻訳鋳型から翻訳される特定タンパク質との相互作用物質の検査方法。

- (1) 無細胞タンパク質合成系を利用するタンパク質チップ試薬を用時溶解する、
- (2) 溶解後、タンパク質翻訳反応条件を調整し、特定タンパク質の合成を行う、
- (3) 検出対象物質を添加し、用時合成された特定タンパク質との相互反応の有無を確認する、
- (4) 相互反応物質についてマーカーを使って質的又は量的に判定する。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 タンパク質チップ作製用試薬

【技術分野】

【0001】

本発明は無細胞タンパク質合成系を用いたタンパク質チップ試薬、無細胞タンパク質合成系を用いたタンパク質チップ試薬用キット、およびこの試薬を利用した検査方法に関する。具体的には、無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有液にタンパク質合成に必要な物質、翻訳鋳型および安定化剤等を添加した翻訳反応溶液を凍結乾燥することにより製造される試薬を用いて、用時タンパク質を発現させ、該タンパク質との相互作用を用いる検査用試薬、キット、検査方法に関する。

【背景技術】

【0002】

細胞内で行われているタンパク質の合成反応は、まず遺伝情報をもつDNAからその情報がmRNAに転写され、そしてリボソームがそのmRNAの情報を翻訳して、タンパク質を合成するという工程で進行している。現在、この細胞内におけるタンパク質合成を試験管等の生体外で行う方法としては、例えばリボソームやその他のタンパク質合成に必要な成分を生物体から抽出し（本明細書中では、これを「無細胞タンパク質合成用細胞抽出物」と称することがある）、これらを用いた試験管内での無細胞タンパク質合成法の研究が盛んに行われている（特許文献1、特許文献2、特許文献3、特許文献4、特許文献5）。

【0003】

これらの無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有液、及び該抽出物含有液に、翻訳鋳型や酵素を除く翻訳反応に必要な成分を添加したタンパク質合成反応液（以下、これを「レディメイド型細胞抽出物含有液」と称することがある）は、常温では不安定であり-80℃以下の超低温でのみ安定な保存が可能であった。しかし、無細胞タンパク質合成系は、翻訳反応の正確性や速度において生細胞に匹敵する性能を保持し、かつ特定タンパク質を複雑な精製工程を実施することなく得ることができる有用な方法である。そのため該合成系をより産業上に適用するため、合成効率の上昇のみならず上記の合成用細胞抽出物含有液やレディメイド型細胞抽出物含有液を安定的に高品質を保持して提供することが必要である。

【0004】

従来は無細胞タンパク質合成反応のためには、細胞抽出物含有液を初め、アミノ酸、ATP、GTPやカリウム、マグネシウムといった種々の成分をそれぞれ安定な状態で保持しておき、タンパク質合成反応開始に先だってそれらを最適の割合で混合する必要があった。この方法には、保存方法の他に、煩雑な操作を必要とすることから、合成試料が多数の場合には大きな困難を伴った。さらに、この従来法では、ハイスループットなタンパク質の合成のための全自動化システムの構築のネックとなっている。

【0005】

本発明者らは先にタンパク質合成用細胞抽出物含有液やレディメイド型細胞抽出物含有液を凍結乾燥により製剤化する方法を提案している（特許文献6）が、該製剤は凍結乾燥工程中に溶解等が起り、その結果該製剤の品質の低下が見られるという問題があった。品質の低下とは、該製剤に水を添加した際、製剤が完全に溶解せず、これを用いたタンパク質合成反応における合成活性も低下するものである。

【0006】

上記問題を解決するために、イノシトール等の多価アルコールを凍結保存下での安定化のために添加し、さらに潮解性物質の含有量を低下させることで保存性が向上した凍結乾燥製剤の提案もある（特許文献7）。しかし、これは無細胞抽出物含有液を製剤化したものであるため、多検体を扱う場合には翻訳反応に必要な物質や翻訳鋳型を添加する必要があり操作が煩雑であること、また翻訳鋳型であるmRNAは非常に不安定であり、用時調製が必須であることなどから必ずしもハイスループット化に適した製剤とは言い難い。

【0007】

また、従来の特定タンパク質との相互作用物質の検査方法では、多検体と特定タンパク質の相互反応を解析するために、上記のように翻訳反応に必要な物質や特定翻訳鋳型をタンパク質を発現する前に、添加する必要があることが操作が煩雑であること、また翻訳鋳型である mRNA は非常に不安定であり、用時調製が必須であることなどから、多検体を迅速かつ簡便に検査できる方法が確立されていなかった。

【0008】

一方、生体内で発現する全てのタンパク質を対象にして解析を行うプロテオーム解析は、発現プロテオミクスと機能（相互作用）プロテオミクスに大別される。

発現プロテオミクスは、生体内である特定のタンパク質がどこでどの程度発現しているかを網羅的に解析する手法であり、また機能プロテオミクスは、ある特定のタンパク質が如何なる分子と相互作用しているかを網羅的に解析する手法である。従来これらの解析は、二次元電気泳動、酵母による 2-ハイブリッド法、表面プラズモン法、ファージディスプレイ法等により行われていたが、分析時間、感度、擬陽性、解析に必要な資料の量等の問題があり、タンパク質を高密度に集積したタンパク質チップの開発が進められている。

【0009】

タンパク質チップとしては、抗体チップに血清等を接触させ、該チップ上で生じる抗原抗体反応を固相酵素免疫検定法（以下、これを「ELISA法」と称することがある）により検出するものや、タンパク質を固相化したチップと MALDI-TOF MS（マトリクス支援イオン化-飛行時間型質量分析計：（非特許文献 1、非特許文献 2））を組み合わせた SELDI（Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization）プロテインチップシステム等が開発されている。

【0010】

これらの解析手段等においては、その再現性等に大きく影響するタンパク質チップの質が問題となっている。タンパク質は、その 3 次元構造が保たれて初めて本来の機能を持つものであるため、固相化される際にその 3 次元構造が破壊されることを防ぐために基盤の表面化学技術が開発されている。また、タンパク質は DNA 等に比べて非常に不安定であり、また合成操作も煩雑であることから多検体を機能を保ったまま扱うことが困難であった。さらには、作製されたチップは 3 日程度以内に使用しなければならず、その取扱が不便であった。

【0011】

【特許文献 1】特開平 6-98790 号公報

【特許文献 2】特開平 6-225783 号公報

【特許文献 3】特開平 7-194 号公報

【特許文献 4】特開平 9-291 号公報

【特許文献 5】特開平 7-147992 号公報

【特許文献 6】特開 2000-316594 号公報

【特許文献 7】特開 2002-125693 号公報

【非特許文献 1】Koster, H., et al., Nature Biotechnol., 14, 1123-1128(1996)

【非特許文献 2】Griffin, T. J., et al., Nature Biotechnol., 15, 1368-1372(1997)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明は、上記したタンパク質チップ等を用いたハイスループット解析又は特定タンパク質を用いた検査における多検体での無細胞タンパク質合成に特に有利となるような簡便な操作による無細胞タンパク質合成系を用いたタンパク質チップ試薬、およびそれを用いたキットを提供することを目的とする。さらに、上記試薬を用いたタンパク質ライブラリー、あるいはタンパク質チップの作製用キット、相互作用物質の検査方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有液にタンパク質合成に必要な物質、翻訳鋳型及び安定化剤を添加した翻訳反応溶液をマイクロタイタープレートのウェル内で凍結乾燥し、該ウェルに酢酸カルシウム溶液を添加して試薬を溶解した後に、無細胞タンパク質合成に用いられる基質、エネルギー源等を含む溶液を重層して翻訳反応を行わせたところ、マイクロタイタープレートの翻訳反応溶液中で特定のタンパク質が合成されることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて成し遂げられたものである。

【0014】

本発明は以下よりなる。

「1. 以下の要素を含む、無細胞タンパク質合成系を利用するタンパク質チップ試薬。

a: 胚乳成分及び低分子のタンパク質合成阻害物質が実質的に除去された小麦胚芽抽出物からなる無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有液が、複数の領域に区画された容器のそれぞれ異なるウェルに添加されている、

b: 少なくとも、基質及びエネルギー源を含むタンパク質合成に必要な物質、及び特定翻訳鋳型がaに記載のウェルに添加されている、

c: bに記載のウェル中の溶液が凍結乾燥により凍結乾燥剤化されている。

2. 以下の要素を含む、無細胞タンパク質合成系を利用するタンパク質チップ試薬。

a: 胚乳成分及び低分子のタンパク質合成阻害物質が実質的に除去された小麦胚芽抽出物からなる無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有液が、複数の領域に区画された容器のそれぞれ異なるウェルに添加されている、

b: 少なくとも、基質及びエネルギー源を含むタンパク質合成に必要な物質、及び特定翻訳鋳型がaに記載のウェルに添加されている、

c: bに記載のウェル中の溶液が凍結乾燥により凍結乾燥剤化されている、

d: cに記載の凍結乾燥剤中の潮解性物質含有量が、該凍結乾燥製剤中のタンパク質1重量部に対して0.01重量部以下である。

3. 以下の要素を含む、無細胞タンパク質合成系を利用するタンパク質チップ試薬。

a: 胚乳成分及び低分子のタンパク質合成阻害物質が実質的に除去された小麦胚芽抽出物からなる無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有液が、複数の領域に区画された容器のそれぞれ異なるウェルに添加されている、

b: 少なくとも、基質及びエネルギー源を含むタンパク質合成に必要な物質、及び特定翻訳鋳型がaに記載のウェルに添加されている、

c: bに記載のウェル中の溶液が凍結乾燥により凍結乾燥剤化されている、

d: cに記載の凍結乾燥剤中の潮解性物質含有量が、該凍結乾燥製剤中のタンパク質1重量部に対して0.01重量部以下である、

e: bに記載の翻訳鋳型が2種以上の翻訳鋳型を含み、複数の領域に区画された容器のそれぞれの異なるウェル内で2種以上のタンパク質を合成可能とする。

4. 以下の要素を含む、無細胞タンパク質合成系を利用するタンパク質チップ試薬。

a: 胚乳成分及び低分子のタンパク質合成阻害物質が実質的に除去された小麦胚芽抽出物からなる無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有液が、複数の領域に区画された容器のそれぞれ異なるウェルに添加されている、

b: 少なくとも、基質及びエネルギー源を含むタンパク質合成に必要な物質、及び特定翻訳鋳型がaに記載のウェルに添加されている、

c: bに記載のウェル中の溶液が凍結乾燥により凍結乾燥剤化されている、

d: cに記載の凍結乾燥剤中の潮解性物質含有量が、該凍結乾燥製剤中のタンパク質1重量部に対して0.01重量部以下である、

e: bに記載の翻訳鋳型が2種以上の翻訳鋳型を含み、複数の領域に区画された容器のそれぞれの異なるウェル内で2種以上のタンパク質を合成可能とする。

f: 翻訳鋳型から合成されるタンパク質が固定化用修飾を受けており、かつウェル内表面及

び／又はウェル中の担体に該固定化用修飾により付加される物質と親和性を有する物質がコーティングされている。

5. 固定化用修飾が、アビジン化、ビオチン化、ストレプトアビジン化、Hisタグ化から少なくとも1つが選択される前項4に記載の無細胞タンパク質合成系を利用するタンパク質チップ試薬。

6. 前項1～5の何れかーに記載の無細胞タンパク質合成系を利用するタンパク質チップ試薬を含む無細胞タンパク質合成用キット。

7. 前項1～5の何れかーに記載の試薬を用いた、以下の要素を含む特定翻訳鑄型から翻訳される特定タンパク質との相互作用物質の検査方法。

- (1) 無細胞タンパク質合成系を利用するタンパク質チップ試薬を用時溶解する、
- (2) 溶解後、タンパク質翻訳反応条件を調整し、特定タンパク質の合成を行う、
- (3) 検出対象物質を添加し、用時合成された特定タンパク質との相互反応の有無を確認する、
- (4) 相互反応物質についてマーカーを使って質的又は量的に判定する。」

【発明の効果】

【0015】

本発明の翻訳鑄型を含む翻訳反応溶液を凍結乾燥剤化した無細胞タンパク質合成用試薬によれば、凍結乾燥のために低減させた酢酸カリウム等の潮解性物質を含む溶液を添加して溶解し、これを適当な温度に保つだけで、高効率で特定のタンパク質を合成することができる。この技術によれば、マイクロタイタープレートの各ウェル中に凍結乾燥された異なる翻訳鑄型を含む合成試薬が含まれるタンパク質ライブラリー作製用キット等が提供され、合成されたタンパク質に合成容器の底部に結合する構造を持たせることによりタンパク質チップ作製用キットも提供される。このように本発明は、多くのクローンを扱うタンパク質の機能等のハイスループット解析又は特定タンパク質を用いた検査に特に有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

(1) 無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有液の調製

本発明に用いられる無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有液としては、無細胞タンパク質合成系においてタンパク質合成能を有する小麦胚芽抽出液が最適である。ここで、無細胞タンパク質合成系とは、細胞内に備わるタンパク質翻訳装置であるリボソーム等を含む成分を生物体から抽出し、この抽出液に転写、または翻訳鑄型、基質となる核酸、アミノ酸、エネルギー源、各種イオン、緩衝液、及びその他の有効因子を加えて試験管内で行う方法である。このうち、鑄型としてRNAを用いるもの（これを以下「無細胞翻訳系」と称することがある）と、DNAを用い、RNAポリメラーゼ等転写に必要な酵素をさらに添加して反応を行うもの（これを以下「無細胞転写／翻訳系」と称することがある）がある。本発明における無細胞タンパク質合成系は、上記の無細胞翻訳系、無細胞転写／翻訳系のいずれをも含む。

【0017】

本発明に用いられる細胞抽出物含有液として具体的には、大腸菌等の微生物、植物種子の胚芽、ウサギ等の哺乳動物の網状赤血球等から調製されたものが用いられる。細胞抽出物含有液は、市販のものを用いることもできるし、上記微生物、胚芽、網状赤血球等からそれ自体既知の方法、具体的には、例えば大腸菌等の微生物細胞抽出物含有液は、Pratt, J.M.etal., Transcription and Translation, Hames, 179-209, B.D.&Higgins, S.J., eds, IRL Press, Oxford(1984)に記載の方法等に準じて調製することもできる。

【0018】

市販の細胞抽出物含有液としては、大腸菌由来のものは、E.coli S30 extract system (Promega社製) とRTS 500 Rapid Translation System (Roche社製) 等が挙げられ、ウサギ網状赤血球由来のものはRabbit Reticulocyte Lysate System (Promega社製) 等、さらに特に好ましい小麦胚芽抽出液であるコムギ胚芽由来のものはPROTEIOS™ (TOYOBO社製) 等

が挙げられる。植物種子としては、コムギ、オオムギ、イネ、コーン等のイネ科の植物のものが好ましい。本発明の細胞抽出物含有液としては、このうちコムギ胚芽抽出液を用いたものが好適である。

【0019】

コムギ胚芽抽出液の調製法としては、コムギ胚芽の単離方法として、例えばJohnston, F. B. et al., Nature, 179, 160-161 (1957)に記載の方法等が用いられ、また単離した胚芽からの細胞抽出物含有液の抽出方法としては、例えば、Erickson, A. H. et al., (1996) Meth. In Enzymol., 96, 38-50等に記載の方法を用いることができる。

【0020】

本発明で好適に利用される胚芽抽出物は、原料細胞自身が含有する又は保持するタンパク質合成機能を抑制する物質（トリチン、チオニン、リボヌクレアーゼ等の、mRNA、tRNA、翻訳タンパク質因子やリボソーム等に作用してその機能を抑制する物質）を含む胚乳がほぼ完全に取り除かれ純化されている。ここで、胚乳がほぼ完全に取り除かれ純化されているとは、リボソームが実質的に脱アデニン化されない程度まで胚乳部分を取り除いた胚芽抽出物のことであり、また、リボソームが実質的に脱アデニン化されない程度とは、リボソームの脱アデニン化率が7%未満、好ましくは1%以下になっていることをいう。

【0021】

上記胚芽抽出物は、細胞抽出物含有液由来および必要に応じて別途添加されるタンパク質を含有する。その含有量は、特に限定されないが、凍結乾燥状態での保存安定性、使い易さ等の点から、凍結乾燥前の組成物において、当該組成物全体の好ましくは1~10重量%、より好ましくは2.5~5重量%であり、また、凍結乾燥後の凍結乾燥組成物において、当該凍結乾燥組成物全体の好ましくは10~90重量%、より好ましくは25~70重量%である。なお、ここでいうタンパク質含有量は、吸光度（260, 280, 320 nm）を測定することにより算出されるものである。

【0022】

（2）細胞抽出物含有液からの潮解性物質の低減化

上記細胞抽出物含有液は、抽出溶媒、あるいは抽出した後に行うゲルろ過に用いる緩衝液などが酢酸カリウム、酢酸マグネシウムなどの潮解性物質を含んでいる。このため、該細胞抽出物含有液を使い翻訳反応溶液を調製し、そのまま乾燥製剤とした場合、凍結乾燥工程において溶解等が起こり、その結果該製剤の品質の低下が見られるという問題がある。品質の低下とは、該製剤に水を添加した際、製剤が完全に溶解せず、これを用いたタンパク質合成反応における合成活性も低下するものである。

【0023】

そこで、該細胞抽出物含有液に含まれる潮解性物質の濃度を凍結乾燥した後に製剤の品質に影響を及ぼさない程度に低減する。潮解性物質の具体的な低減方法としては、例えば、予め潮解性物質を低減、または含まない溶液で平衡化しておいたゲル担体を用いたゲルろ過法、あるいは透析法等が挙げられる。このような方法により最終的に調製される翻訳反応溶液中の潮解性物質の終濃度として60 mM以下となるまで低減する。具体的には、コムギ胚芽抽出物含有液を用いる場合、最終的に調製される翻訳反応溶液に含まれる酢酸カリウムの濃度を60 mM以下、好ましくは50 mM以下に低減する。

【0024】

そして、さらに凍結乾燥処理された製剤における、潮解性を示す物質（潮解性物質）は、凍結乾燥状態での保存安定性を低下させない含有量は、当該凍結乾燥製剤中に含有されるタンパク質1重量部に対して、0.01重量部以下が好ましく、特に0.005重量部以下が好ましい。

【0025】

潮解性物質の低減は、細胞抽出物含有液を調製した後に行ってもよいし、細胞抽出物含有液の調製に至るいずれかの工程において行うこともできる。

【0026】

細胞抽出物含有液には、微生物、特に糸状菌（カビ）などの孢子が混入していることが

あり、これら微生物を除去しておくことが好ましい。特に長期（1日以上）の無細胞タンパク質合成反応中に微生物の繁殖が見られることがあるので、これを阻止することは重要である。微生物の除去手段は特に限定されないが、ろ過滅菌フィルターを用いるのが好ましい。フィルターのポアサイズとしては、混入する可能性のある微生物が除去可能なサイズであれば特に限定されないが、通常0.1～1マイクロメートル、好ましくは0.2～0.5マイクロメートルが適当である。

【0027】

さらに、細胞抽出物含有液の調製工程の何れかの段階において低分子合成阻害物質の除去工程、および／または還元剤濃度の低減工程を加えることにより特定の効果を有する無細胞タンパク質合成を行うための細胞抽出物含有液とすることができる。

【0028】

（3）細胞抽出物含有液から低分子合成阻害物質の除去方法

細胞抽出物含有液は、タンパク質合成阻害活性を有する低分子の合成阻害物質（以下、これを「低分子合成阻害物質」と称することがある）を含んでおり、これらを取り除くことにより、タンパク質合成活性の高い細胞抽出物含有液を取得することができる。具体的には、細胞抽出物含有液の構成成分から、低分子合成阻害物質を分子量の違いにより分画除去する。低分子合成阻害物質は、細胞抽出物含有液中に含まれるタンパク質合成に必要な因子のうち最も小さいものの以下の分子量を有する分子として分画することができる。具体的には、分子量50,000～14,000以下、好ましくは14,000以下のものとして分画、除去し得る。

【0029】

低分子合成阻害物質の細胞抽出物含有液からの除去方法としては、それ自体既知の通常用いられる方法が用いられるが、具体的には、透析膜を介した透析による方法、ゲルろ過法、あるいは限外ろ過法等が挙げられる。このうち、透析による方法が、透析内液に対しての物質の供給のし易さ等の点において好ましい。

【0030】

透析による低分子合成阻害物質の除去操作に用いる透析膜としては、50,000～12,000の除去分子量を有するものが挙げられる、具体的には除去分子量12,000～14,000の再生セルロース膜（Viskase Sales, Chicago製）や、除去分子量50,000のスペクトラ／ポア6（SPECTRUM LABORATORIES INC., CA, USA製）等が好ましく用いられる。このような透析膜中に適当な量の細胞抽出物含有液等を入れ常法を用いて透析を行う。透析を行う時間は、30分～24時間程度が好ましい。

【0031】

低分子合成阻害物質の除去を行う際、細胞抽出物含有液に不溶性成分が生成される場合には、この生成を阻害する（以下、これを「細胞抽出物含有液の安定化」と称することがある）ことにより、最終的に得られる細胞抽出物含有液あるいは翻訳反応溶液のタンパク質合成活性を高めることができる。細胞抽出物含有液あるいは翻訳反応溶液の安定化の具体的な方法としては、上述した低分子合成阻害物質の除去を行う際に、細胞抽出物含有液あるいは翻訳反応溶液を、少なくとも高エネルギーリン酸化合物、例えばATPまたはGTP等（以下、これを「安定化成分」と称することがある）を含む溶液として行う方法が挙げられる。高エネルギーリン酸化合物としては、ATPが好ましく用いられる。また、好ましくは、ATPとGTP、さらに好ましくはATP、GTP、及び20種類のアミノ酸を含む溶液で行う。

【0032】

これらの成分は、予め安定化成分を添加し、インキュベートした後、これを低分子阻害物質の除去工程に供してもよいし、低分子合成阻害物質の除去に透析法を用いる場合には、透析外液にも安定化成分を添加して透析を行って低分子合成阻害物質の除去を行うこともできる。透析外液にも安定化成分を添加しておけば、透析中に安定化成分が分解されても常に新しい安定化成分が供給されるのでより好ましい。このことは、ゲルろ過法や限外ろ過法を用いる場合にも適用でき、それぞれの担体を安定化成分を含むろ過用緩衝液によ

り平衡化した後に、安定化成分を含む細胞抽出物含有液あるいは翻訳反応溶液を供し、さらに上記緩衝液を添加しながらろ過を行うことにより同様の効果を得ることができる。

【0033】

安定化成分の添加量、及び安定化処理時間としては、細胞抽出物含有液の種類や調製方法により適宜選択することができる。これらの選択の方法としては、試験的に量及び種類をふった安定化成分を細胞抽出物含有液に添加し、適当な時間の後に低分子阻害物質の除去工程を行い、取得された処理後細胞抽出物含有液を遠心分離等の方法で可溶化成分と不溶化成分に分離し、そのうちの不溶性成分が少ないものを選択する方法が挙げられる。さらには、取得された処理後細胞抽出物含有液を用いて無細胞タンパク質合成を行い、タンパク質合成活性の高いものを選択する方法も好ましい。また、上述の選択方法において、細胞抽出物含有液と透析法を用いる場合、適当な安定化成分を透析外液にも添加し、これらを用いて透析を適当時間行った後、得られた細胞抽出物含有液中の不溶性成分量や、得られた細胞抽出物含有液のタンパク質合成活性等により選択する方法も挙げられる。

【0034】

このようにして選択された細胞抽出物含有液の安定化条件の例として、具体的には、透析法により低分子合成阻害物質の除去工程を行う場合においては、そのコムギ胚芽抽出物含有液、及び透析外液中に、ATPとしては $100\mu\text{M}$ ～ 0.5mM 、GTPは $25\mu\text{M}$ ～ 1mM 、20種類のアミノ酸としてはそれぞれ $25\mu\text{M}$ ～ 5mM 添加して30分～1時間以上の透析を行う方法等が挙げられる。透析を行う場合の温度は、細胞抽出物含有液のタンパク質合成活性が失われず、かつ透析が可能な温度であれば如何なるものであってもよい。具体的には、最低温度としては、溶液が凍結しない温度で、通常 -10°C 、好ましくは -5°C 、最高温度としては透析に用いられる溶液に悪影響を与えない温度の限界である 40°C 、好ましくは 38°C である。

【0035】

また、低分子合成阻害物質の除去を細胞抽出物含有液として調製した後に行えば、上記安定化成分を細胞抽出物含有液にさらに添加する必要はない。

【0036】

(4) 細胞抽出物含有液の還元剤濃度の低減方法

細胞抽出物含有液に含まれる還元剤の濃度を低減させて無細胞タンパク質合成を行うことによれば、特定タンパク質の分子内に存在するジスルフィド結合が形成された状態でタンパク質を取得することができる。細胞抽出物含有液中の還元剤の低減方法としては、細胞抽出物含有液を調製するに至る工程の何れかにおいて還元剤低減工程を行う方法が用いられる。還元剤は、最終的に調製される細胞抽出物含有液中の濃度として、該細胞抽出物含有液を用いた翻訳反応においてタンパク質が合成され得て、かつ分子内ジスルフィド結合が形成、保持され得る濃度に低減される。具体的な還元剤の濃度としては、ジチオスレイトール（以下、これを「DTT」と称することがある）の場合、細胞抽出物含有液から調製された最終的な翻訳反応溶液中の終濃度が、 $20\sim70\mu\text{M}$ 、好ましくは $30\sim50\mu\text{M}$ に低減される。また、2-メルカプトエタノールの場合には、翻訳反応溶液中の最終濃度が、 $0.1\sim0.2\text{mM}$ に低減される。さらに、グルタチオン／酸化型グルタチオンの場合には、翻訳反応溶液中の最終の濃度が $30\sim50\mu\text{M}$ ／ $1\sim5\mu\text{M}$ となるように低減される。上述した具体的な還元剤の濃度は、これら限定されるものではなく、合成しようとするタンパク質、あるいは用いる無細胞タンパク質合成系の種類により適宜変更することができる。

【0037】

還元剤の至適濃度範囲の選択法としては、特に制限はないが、例えば、ジスルフィド結合交換反応を触媒する酵素の効果によって判断する方法を挙げることができる。具体的には、還元剤の濃度を様々にふった細胞抽出物含有液由来翻訳反応溶液を調製し、これらにジスルフィド結合交換反応を触媒する酵素を添加して分子内にジスルフィド結合を有するタンパク質合成を行う。また、対照実験として同様の翻訳反応溶液にジスルフィド結合交換反応を触媒する酵素を添加しないで同様のタンパク質合成を行う。ここで合成されるタ

ンパク質の可溶化成分を、例えば遠心分離等の方法により分離する。この可溶化成分が全体の50%（可溶化率50%）以上であり、またその可溶化成分がジスルフィド結合交換反応を触媒する酵素の添加により増加した反応液が、該タンパク質の分子内ジスルフィド結合を保持したまま合成する反応液として適していると判断することができる。さらには、上記のジスルフィド結合交換反応を触媒する酵素の効果によって選択された還元剤の濃度範囲のうち、合成されるタンパク質量の最も多い還元剤の濃度をさらに好ましい濃度範囲として選択することができる。

【0038】

具体的な還元剤の低減方法としては、還元剤を含まない細胞抽出物含有液を調製し、これに無細胞タンパク質合成系に必要な成分とともに、上記の濃度範囲となるように還元剤を添加する方法や、細胞抽出物含有液由来の翻訳反応溶液から上記の濃度範囲となるように還元剤を除去する方法等が用いられる。無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有液はこれを抽出する際に高度の還元条件を必要とするため、抽出後にこの溶液から還元剤を取り除く方法がより簡便である。細胞抽出物含有液から還元剤を取り除く方法としては、ゲルろ過用担体を用いる方法等が挙げられる。具体的には、例えば、セファデックスG-25カラムを予め還元剤を含まない適当な緩衝液で平衡化してから、これに細胞抽出物含有液を通す方法等が挙げられる。

【0039】

(5) 翻訳反応溶液の調製

以上のように調製された細胞抽出物含有液は、これにタンパク質合成に必要な核酸分解酵素阻害剤、各種イオン、基質、エネルギー源等（以下、これらを「翻訳反応溶液添加物」と称することがある）及び翻訳鋳型となる特定タンパク質をコードするmRNA、加えて所望によりイノシトール、トレハロース、マンニトールおよびスクロースーエピクロロヒドリン共重合体からなる群から選択される少なくとも1種の成分を含有する安定化剤を添加して翻訳反応溶液を調製する。各成分の添加濃度は、自体公知の配合比で達成可能である。

【0040】

翻訳反応溶液添加物として、具体的には、基質となるアミノ酸、エネルギー源、各種イオン、緩衝液、ATP再生系、核酸分解酵素阻害剤、tRNA、還元剤、ポリエチレングリコール、3', 5'-cAMP、葉酸塩、抗菌剤等が挙げられる。また、それぞれ濃度は、ATPとしては100 μ M~0.5mM、GTPは25 μ M~1mM、20種類のアミノ酸としてはそれぞれ25 μ M~5mM含まれるように添加することが好ましい。これらは、翻訳反応系に応じて適宜選択して組み合わせ用いることができる。具体的には、細胞抽出物含有液としてコムギ胚芽抽出液を用いた場合には、20mMHEPES-KOH (pH7.6)、100mM酢酸カリウム、2.65mM酢酸マグネシウム、0.380mMスベルミジン（ナカライ・テスク社製）、各0.3mM L型アミノ酸20種類、4mMジチオスレイトール、1.2mM ATP（和光純薬社製）、0.25mM GTP（和光純薬社製）、16mMクレアチンリン酸（和光純薬社製）、1U/ μ l RNaseinhibiter（TAKARA社製）、0.5 μ g/lクレアチンキナーゼ（Roche社製）を加え、十分溶解した後、翻訳鋳型mRNA（ Ω GFP）1 μ gを入れたもの等が例示される。

【0041】

ここで、mRNAは、無細胞タンパク質合成系において合成され得るタンパク質をコードするものが、適当なRNAポリメラーゼが認識する配列と、さらに翻訳を活性化する機能を有する配列の下流に連結された構造を有していれば如何なるものであってもよい。RNAポリメラーゼが認識する配列とは、T3またはT7 RNAポリメラーゼプロモーター等が挙げられる。本発明の無細胞タンパク質合成用試薬を用いてタンパク質チップ、あるいはライブラリー等を作製する場合には、それぞれの目的に応じて適宜選択される。また、無細胞タンパク質合成系において翻訳活性を高める配列として Ω 配列等をコーディング配列の5'上流側に連結させた構造を有するものが好ましく用いられる。

【0042】

(6) 凍結乾燥方法

凍結乾燥は、細胞抽出物含有液、特定翻訳鋳型、及び翻訳反応溶液添加物は選択的に混合して凍結乾燥処理が行われる。また、核酸分解酵素阻害剤、各種イオン、基質、エネルギー源等の翻訳反応溶液添加物の選択されたものを別途キット化し、用時これを補充的に蛋白質合成反応系に加える態様も好ましい。

その態様の組み合わせは以下ようになる。

タイプ1 細胞抽出物含有液、特定翻訳鋳型、翻訳反応溶液添加物を一体化混合して、凍結乾燥製剤化する。

タイプ2 細胞抽出物含有液、特定翻訳鋳型、翻訳反応溶液添加物を一体化混合して凍結乾燥製剤化し、さらに翻訳反応溶液添加物をキット化しておき、蛋白質合成反応時に翻訳反応溶液添加物をセルの上層部に追加添加する。

タイプ3 セルの下層部に細胞抽出物含有液、上層部に特定翻訳鋳型及び翻訳反応溶液添加物を重層させ、凍結乾燥製剤化する。

タイプ4 タイプ3に加えて、さらに翻訳反応溶液添加物をキット化しておき、蛋白質合成反応時に翻訳反応溶液添加物を上層部に追加添加する。

タイプ5 細胞抽出物含有液、特定翻訳鋳型を混合して凍結乾燥製剤化し、翻訳反応溶液添加物をキット化しておき、蛋白質合成反応時に翻訳反応溶液添加物を上層部に追加添加する。

【0043】

凍結乾燥の方法は、それ自体既知の通常用いられる方法から適宜選択することができるが、具体的には、例えば、液体窒素により急速に凍結させ、真空ポンプ等により減圧させた後、容器の温度を徐々に上昇させることにより行うことができる。通常は、市販の凍結乾燥機が用いられる。凍結乾燥温度及び時間等は、用いる凍結乾燥機の使用方法に準じることが好ましい。このようにして除水が完成して得られる本発明の凍結乾燥製剤は室温で非常に安定であり、かつこれに水などを添加した細胞抽出物含有液は超低温により保存した場合と遜色のないタンパク質合成活性を有するものである。また、保存容器中の空気を窒素ガスに置換することは、該製剤の保存方法としてさらに好適である。本発明で細胞抽出液の凍結乾燥前調製時の濃度は、 $0.1 \sim 100 \text{ mg/ml}$ の濃度に調整されることが好ましく、より最適には $1 \sim 50 \text{ mg/ml}$ に調整される。凍結乾燥は、充填品を凍乾庫内に入庫し、静置する。次に、凍乾機内を -30°C 以下に冷却し充填品を凍結させる。凍結後、凍乾庫内を減圧し、充填品が融解しない温度まで上昇させて水分を昇華させて一次凍乾を行う。その後、凍乾機内を上昇させて付着水を除去することにより二次乾燥を行う。

【0044】

容器は、複数の領域に区画されており、それらの区画に投入した上記翻訳反応溶液が混ざり合わないものであれば特に制限はない、区画の数も特に制限はないが、 $10 \sim 200$ の範囲であれば良く、特に好ましくは、48個、96個、384個、1536個等規格にそった数が挙げられる。容器の材質は、特に制限はなく、市販のマイクロタイタープレート等が好ましく用いられる。容器中のどのウェルにどの翻訳鋳型を含む無細胞タンパク質合成用試薬を入れるかについては、特に制限はないが、ウェルの位置（座標）と翻訳鋳型の対応が付くようにすることが好ましい。さらに、96Wellプレート等を設置できるトレイを持つ各社から市販されている一般的な自動分注器を用いることによって、タンパク質合成に必要な物質、翻訳鋳型及び安定化剤を自動で分注できる。これらの自動分注の設定操作は、自動分注器を通常使用している当業者なら容易にプログラムを変更することによってできる。

【0045】

(7) 無細胞タンパク質合成系を利用するタンパク質チップ試薬の作製方法

試薬は少なくとも以下の要素を含むことによって作製できる。

a: 無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有液をピペットマン等及び／又は自動分注器のチャンネルピペッターにより複数の領域に区画された容器のそれぞれ異なるウェルに、該ウェルの容量に適した無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有液を添加する。

- b: タンパク質合成に必要な物質、翻訳鋳型及び安定化剤を含む溶液をaに記載の各ウェルにピペットマン等及び/又は自動分注器のチャンネルピペッターにより必要量添加する。
c: bで調製されたウェル中の溶液を上記凍結乾燥方法により凍結乾燥剤化する。

また、所望により以下の処理が施された成分を用いることが可能である。

凍結乾燥製剤中の潮解性物質の低減化がなされた成分。

無細胞タンパク質合成用細胞抽出物が低分子のタンパク質合成阻害物質の除去処理がされている、及び/又は還元剤濃度の低減化処理がされている。

【0046】

(8) 無細胞タンパク質合成系を利用するタンパク質チップ試薬を用いたタンパク質の合成方法

上記調製された無細胞タンパク質合成系を利用するタンパク質チップ試薬は、前記で低減した潮解性物質および水をタンパク質合成反応に適した濃度になるように添加した溶解液で溶解し、それぞれ選択されたそれ自体既知のシステム、または装置に投入してタンパク質合成を行うことができる。タンパク質合成のためのシステムまたは装置としては、バッチ法 (Pratt, J.M. et al., Transcription and Translation, Hames, 179-209, B.D. & Higgins, S.J., eds, IRL Press, Oxford (1984)) のように、本発明の無細胞タンパク質合成系を利用するタンパク質チップ試薬を溶解した翻訳反応溶液を適当な温度に保って行う方法や、無細胞タンパク質合成系に必要なアミノ酸、エネルギー源等を連続的に反応系に供給する連続式無細胞タンパク質合成システム (Spirin, A.S. et al., Science, 242, 1162-1164 (1988))、透析法 (木川等、第21回日本分子生物学会、WID6)、あるいは無細胞タンパク質合成系に必要なアミノ酸、エネルギー源等を含む溶液を翻訳反応溶液上に重層する方法 (重層法: 特許公開番号 W0 02/24939 A1) 等が挙げられる。

【0047】

ここで、還元剤濃度を低減した無細胞タンパク質合成系を利用するタンパク質チップ試薬を用いた場合には、無細胞タンパク質合成系に必要なアミノ酸、エネルギー源等を供給する溶液についても同様の還元剤の濃度に調製する。さらに、翻訳反応をジスルフィド結合交換反応を触媒する酵素の存在下で行えば、分子内のジスルフィド結合が保持されたタンパク質を高効率で合成することができる。ジスルフィド結合交換反応を触媒する酵素としては、例えばタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ等が挙げられる。これらの酵素の上記無細胞翻訳系への添加量は、酵素の種類によって適宜選択することができる。具体的には、コムギ胚芽から抽出した無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有液であって、還元剤としてDTTを20~70、好ましくは30~50 μ M含有する翻訳反応溶液にタンパク質ジスルフィドイソメラーゼを添加する場合、翻訳反応溶液としての最終濃度で0.01~10 μ Mの範囲、好ましくは0.5 μ Mとなるように添加する。また、添加の時期はジスルフィド結合が形成される効率から翻訳反応開始前に添加しておくことが好ましい。

【0048】

(9) タンパク質ライブラリーの作製

本発明の試薬及び/又はキットは、それぞれ異なる翻訳鋳型を含むもの2種以上を、複数の領域に区画された容器のそれぞれ異なるウェル内で凍結乾燥することによりタンパク質ライブラリー作製用キットとして調製することができる。翻訳反応溶液の作製法および翻訳鋳型であるmRNAの添加量等は上記記載の通りである。また、容器と凍結乾燥方法は上記記載の通りである。

【0049】

本発明のタンパク質ライブラリー用試薬は、これに無細胞タンパク質合成反応に適した濃度の緩衝液を添加して溶解し、適当な温度に保持することにより同時に2種以上のタンパク質を合成することができ、タンパク質ライブラリーを作製することができる。翻訳反応の方法は上記記載の通りである。

【0050】

本発明のタンパク質ライブラリー用試薬により作製されたタンパク質ライブラリーは、例えば、タンパク質チップとして用いることができる。特に機械化されたタンパク質チッ

プ製造を行う場合には、本発明のキットに用いる容器として、タンパク質チップ製造器の規格に添ったマイクロタイタープレートを用いることが好ましい。

【0051】

(10) タンパク質チップ試薬の態様

翻訳反応溶液に含まれる翻訳鋳型が、それがコードするタンパク質に固定化用修飾を付加する構造を有するものであり、それぞれが異なる該翻訳鋳型を含む2種以上の翻訳反応溶液を、複数の領域に区画された容器であって、上記固定化用修飾によって付加される物質と親和性を有する物質をウェル底面及び／又はウェル中の担体にコーティングしたそれぞれ異なるウェル内で凍結乾燥することによりタンパク質チップ試薬として調製することができる。

【0052】

タンパク質チップの一態様は、2種以上のタンパク質が適当な基盤（ウェルの表面）に別々に固定化されているチップ或はウェル中に存在するチップを意味する。タンパク質チップは、タンパク質と、タンパク質、核酸、低分子化合物、あるいは糖鎖等との結合性、相互反応性を解析する（以下これを「プロテオーム解析」と称することがある）に用いられる。

【0053】

本発明のタンパク質チップ試薬は、これに無細胞タンパク質合成反応に適した濃度の緩衝液を添加して溶解し、適当な温度に保持することにより同時に数種のタンパク質を合成することができ、合成されたタンパク質がウェルの底部に結合或はウェル内に存在するため、タンパク質チップを作製することができる。翻訳反応の方法は上記記載の通りである。

【0054】

(11) 相互作用物質の検査方法

相互作用物質の検査方法は少なくとも以下の工程を含むことによって実施できる。

- a: 凍結乾燥無細胞タンパク質合成用試薬を用時溶解する。
- b: 無細胞タンパク質合成用試薬を溶解後、タンパク質翻訳反応条件を調整し、上記記載の方法により特定のタンパク質の合成を行い、該タンパク質をウェル内に発現させる。

さらに、所望により又は検体の種類によって、以下の工程を付加する。

- c: 検体をウェルに必要量添加し、合成された特定タンパク質と検体との相互反応を行う。
- d: 相互反応結果をもとに、特定タンパク質と相互作用する物質を検体から質的又は量的に判定する。

【0055】

上記記載のタンパク質チップ試薬及び特定タンパク質との相互作用物質の検査方法では、所望により無細胞タンパク質合成系によって合成されるタンパク質が固定化用修飾を受けており、さらにウェル表面及び／又はウェル中の担体に該固定化用修飾により付加されている物質と親和性を有する物質をコーティングしたウェル及び／又は担体を用いることもできる。

固定化用修飾および固定化用修飾によって付加される物質と親和性を有する物質の組み合わせとしては、例えば、アビジンおよびストレプトアビジン等のビオチン結合タンパク質／ビオチン、マルトース結合タンパク質／マルトース、Gタンパク質／グアニンヌクレオチド、ポリヒスチジンペプチド／ニッケルあるいはコバルト等の金属イオン、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ／グルタチオン、DNA結合タンパク質／DNA、抗体／抗原分子（エピトープ）、カルモジュリン／カルモジュリン結合ペプチド、ATP結合タンパク質／ATP、あるいはエストラジオール受容体タンパク質／エストラジオール等の、各種受容体タンパク質／そのリガンド等が挙げられる。また、担体としては、ビーズ、セファデックスの樹脂等が挙げられるが合成タンパク質が担体表面に結合できれば特に限定されない。

【0056】

翻訳鋳型がコードするタンパク質に固定化用修飾する方法としては、無細胞タンパク質

合成系において合成されるタンパク質に固定化用修飾が行われる方法であればいかなるものであってもよい。具体的には、固定化用修飾により添加される物質（以下これを「固定化用物質」と称することがある）を結合したtRNAを添加した翻訳反応溶液を用いてタンパク質合成を行う方法、物質としてポリペプチドを用いる場合、翻訳鑄型に固定化用物質をコードする配列を付加したものをを用いてタンパク質合成を行う方法、あるいはピューロマイシン等の核酸誘導体によりタンパク質のC末端にタンパク質合成系において直接固定化用物質を添加する方法（特開平11-322781号公報）等を用いることができる。ここで、固定化用物質とタンパク質をコードするmRNAの間には適当な長さのスペーサを挿入することが好ましい。スペーサーとしては、ポリエチレン、ポリエチレングリコール等の高分子物質等が用いられ、好ましくはポリエチレングリコールが用いられる。

【0057】

また、固定化用物質と特異的に結合する物質のウェルへの結合方法としては、それ自体既知の方法を用いることができるが、具体的には、例えば、タンニン酸、ホルマリン、グルタルアルデヒド、ピルビクアルデヒド、ビスージアゾ化ベンジゾン、トルエン-2,4, -ジイソシアネート、アミノ基、カルボキシル基、又は水酸基あるいはアミノ基等を利用する方法を用いることができる。

【0058】

用いられる容器としては、上記記載のものを用いることができるが、プロテオーム解析に用いる検出方法に応じて適宜選択することができる。具体的には、プラスチック、ポリカーボネート、複合糖質、アクリル樹脂、ニトロセルロース、ガラス、あるいはシリコン等の材質よりなるものが挙げられる。また、プロテオーム解析に表面プラズモン法（Cullen, D. C., et al., Biosensors, 3(4), 211-225(1987-88))を用いる場合には、ガラス等の透明の基盤上に金、銀、白金等の金属薄膜が構成されたものが用いられる。

【0059】

翻訳反応溶液に含まれる翻訳鑄型としては、本発明のタンパク質チップ合成キットにより作製したタンパク質チップを用いたプロテオーム解析の目的により適宜選択される。具体的には、例えば、タンパク質の機能解析に用いる場合には、機能性タンパク質をコードする配列を有するmRNAが選択される。例えば、イオンチャンネル、トランスポーター、成長因子、加水分解酵素、合成酵素、酸化・還元酵素、タンパク質性阻害剤、生理活性ペプチド、ペプチド性毒素、Gタンパク質共役型受容体等の受容体、リガンド、抗体等が挙げられる。また、測定対象検体としては、特定タンパク質及び／又は該特定タンパク質の翻訳鑄型と相互反応する物質であれば特に限定されないが、例えばタンパク質、核酸、低分子化合物、あるいは糖鎖等が挙げられる。

【0060】

容器中のどのウェルにどの翻訳鑄型を含む無細胞タンパク質合成用試薬を入れるかについては、特に制限はないが、ウェルの位置（座標）と翻訳鑄型の対応が付くようにすることが好ましい。また、凍結乾燥方法は上記に記載の通りである。

【0061】

特定タンパク質と相互作用する物質を質的又は量的に判定する方法としては、特定タンパク質と検体の相互反応を検出できる方法であれば特に限定されないが、具体的には、固相酵素免疫検定法（Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) : Crowther, J. R., Methods in Molecular Biology, 42, (1995))により解析する場合、通常ELISA法により用いられるプラスチック製のマイクロタイタープレートが好ましい。表面プラズモン共鳴法（Cullen, D. C. et al., Biosciences, 3(4), 211-225 (1987-88))を用いる場合には、ガラス等の透明基盤上に金、銀、白金等の金属薄膜が構成されたものが好ましい。また、エバネッセント場分子イメージング法（Funatsu, T., et al., Nature, 374, 555-559 (1995))を用いる場合には、ガラス等の透明体が好ましく、さらに好ましくは石英ガラス製のものが用いられる。蛍光イメージングアナライズ法を用いる場合には、

通常タンパク質等を固定化するのに用いられるニトロセルロースメンブレンやナイロンメンブレン、あるいはプラスチック製のマイクロタイタープレート等も用いることができる。また、基質を標識化し、無細胞タンパク質合成系で合成される特定タンパク質を標識化し、該標識をマーカーにして、相互作用物質を質的・量的に追跡してもよい。この場合の標識化手段としては、重水素、放射性同位元素、蛍光物質、色源体物質等一般的な手段が例示される。さらに、特定タンパク質の翻訳鑄型に対して相互反応する物質の存在により、無細胞タンパク質合成系で発現する特定タンパク質の発現量又は標識化した特定タンパク質の発現の有無から、特定タンパク質の翻訳鑄型と相互反応する物質における相互反応の質的・量的な判定もできる。

【0062】

以下、実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例により限定されるものではない。

【実施例1】

【0063】

翻訳鑄型を含む翻訳反応溶液の凍結乾燥試薬を用いたタンパク質合成

(1) コムギ胚芽抽出液の調製

北海道産チホクコムギ種子（未消毒）を1分間に100gの割合でミル（Fritsch社製：Rotor Speed Mill pulverisette4型）に添加し、回転数8,000rpmで種子を温和に粉碎した。篩いで発芽能を有する胚芽を含む画分（メッシュサイズ0.7~1.00mm）を回収した後、四塩化炭素とシクロヘキサンの混合液（容量比＝四塩化炭素：シクロヘキサン＝2.4：1）を用いた浮選によって、発芽能を有する胚芽を含む浮上画分を回収し、室温乾燥によって有機溶媒を除去した後、室温送風によって混在する種皮等の不純物を除去して粗胚芽画分を得た。

次に、ベルト式色彩選別機BLM-300K（製造元：株式会社安西製作所、発売元：株式会社安西総業）を用いて、次の通り、色彩の違いを利用して粗胚芽画分から胚芽を選別した。この色彩選別機は、粗胚芽画分に光を照射する手段、粗胚芽画分からの反射光及び／又は透過光を検出する手段、検出値と基準値とを比較する手段、基準値より外れたもの又は基準値内のものを選別除去する手段を有する装置である。

色彩選別機のベージュ色のベルト上に粗胚芽画分を1000乃至5000粒/cm²となるように供給し、ベルト上の粗胚芽画分に蛍光灯で光を照射して反射光を検出した。ベルトの搬送速度は、50m/分とした。受光センサーとして、モノクロのCCDラインセンサー（2048画素）を用いた。

まず、胚芽より色の黒い成分（種皮等）を除去するために、胚芽の輝度と種皮の輝度の間に基準値を設定し、基準値から外れるものを吸引により取り除いた。次いで、胚乳を選別するために、胚芽の輝度と胚乳の輝度の間に基準値を設定し、基準値から外れるものを吸引により取り除いた。吸引は、搬送ベルト上方約1cm位置に設置した吸引ノズル30個（長さ1cm当たり吸引ノズル1個並べたもの）を用いて行った。

この方法を繰り返すことにより胚芽の純度（任意のサンプル1gあたりに含まれる胚芽の重量割合）が98%以上になるまで胚芽を選別した。

得られたコムギ胚芽画分を4℃の蒸留水に懸濁し、超音波洗浄機を用いて洗浄液が白濁しなくなるまで洗浄した。次いで、ノニデット（Nonidet：ナカライ・テクトニクス社製）P40の0.5容量%溶液に懸濁し、超音波洗浄機を用いて洗浄液が白濁しなくなるまで洗浄してコムギ胚芽を得、以下の操作を4℃で行った。

洗浄した胚芽湿重量に対して2倍容量の抽出溶媒（80mM HEPES-KOH pH7.8、200mM酢酸カリウム、10mM酢酸マグネシウム、8mMジチオスレイトール、（各0.6mMの20種類のL型アミノ酸を添加しておいてもよい））を加え、ワーリングブレンダーを用い、5,000~20,000rpmで30秒間ずつ3回の胚芽の限定破碎を行った。このホモジネートから、高速遠心機を用いた30,000×g、30分間の遠心により得られる遠心上清を再度同様な条件で遠心し、上清を取得した。本試料は、-80℃以下の長期保存で活性の低下は見られなかった。取得した上清をボアサイズが0.2μmのフィ

ルター（ニューステラディスク 25：倉敷紡績社製）を通し、ろ過滅菌と混入微細塵芥の除去を行った。

次に、このろ液をあらかじめ溶液〔40 mM HEPES-KOH (pH 7.8)、それぞれ 100 mM 酢酸カリウム、5 mM 酢酸マグネシウム、8 mM ジチオスレイトール、各 0.3 mM の 20 種類 L 型アミノ酸混液（タンパク質の合成目的に応じて、アミノ酸を添加しなくてもよい、標識アミノ酸であってもよい）〕で平衡化しておいたセファデックス G-25 カラムでゲルろ過を行った。得られたろ液を、再度 30,000×g、30 分間の遠心し、回収した上清の濃度を、A260 nm が 90~150 (A260/A280=1.4~1.6) に調整した。

得られたタンパク質合成用細胞抽出物含有液に 20 mM HEPES-KOH (pH 7.6)、100 mM 酢酸カリウム、2.65 mM 酢酸マグネシウム、0.380 mM スペルミジン（ナカライ・テクトニクス社製）、各 0.3 mM L 型アミノ酸 20 種類、4 mM ジチオスレイトール、1.2 mM ATP（和光純薬社製）、0.25 mM GTP（和光純薬社製）、16 mM クレアチンリン酸（和光純薬社製）、1 U/μl RNase inhibitor（TAKARA 社製）、0.5 μg/1 クレアチンキナーゼ（Roche 社製）を添加して翻訳反応溶液原料を調製した。

【0064】

(2) 翻訳鋳型の添加

翻訳鋳型となる mRNA (ΩGFP) は、SP6 プロモーター配列に連結させた翻訳開始反応配列であるタバコモザイクウイルス (TMV) のオメガ (Ω) 配列、さらに 3' 下流に連結させた GFP 遺伝子 DNA を含むプラスミド GFP/pEU (WO 01/27260 号公報) を鋳型として、SP6 RNA polymerase (TOYOBO 社製) を用いて転写を行い、得られた RNA をフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿の後、Nick Column (Amersham Pharmacia Biotech 社製) により精製して用いた。この mRNA、1 μg を実施例 1 で作製した翻訳反応溶液原料に添加し、翻訳反応溶液を調製した。

【0065】

(3) 凍結乾燥製剤化

上記翻訳鋳型が添加された翻訳反応溶液は、これを透析外液に対して透析し、潮解性物質低減型翻訳反応溶液（酢酸カリウム濃度が 0~50 mM）を取得した。

透析後、各翻訳反応溶液を液体窒素で凍結後、凍結乾燥機 (Labconco 社製: Freeze Dry System Freezone 4.5) を用いて添付の取扱説明書に準じた 3 時間の運転で除水した。調製した粉末状の試料は、その成分が化学変化しないように窒素充填下に封管して 4℃ で保存した。

【0066】

(4) 翻訳反応および合成されたタンパク質量の解析

前記凍結乾燥製剤化された無細胞タンパク質合成用試薬を、40~50 μl の 100 mM 酢酸マグネシウム溶液で溶解した。ここで、コントロールとして、前記工程 (1) で調製された翻訳反応溶液原料液に、前記工程 (3) に記載した翻訳鋳型 mRNA を 1 μg 添加したものを調製した。これらの翻訳反応溶液を反応溶液の 10 倍容量の透析外液 (20 mM HEPES-KOH, pH 7.6、100 mM 酢酸カリウム、2.65 mM 酢酸マグネシウム、4 mM ジチオスレイトール、1.2 mM ATP、0.25 mM GTP、16 mM クレアチンリン酸、0.5 mg/ml クレアチンキナーゼ、0.380 mM スペルミジン、20 種類の L 型アミノ酸 (各 0.3 mM)、0.005% NaN₃) に対しての透析系を使い、蛋白質合成反応は 26℃ で 48 時間行った。6、12、24、48 時間ごとに翻訳反応溶液の 5 μl を回収して、合成タンパク質量の測定に用いた。透析膜は、除去分子量 50,000 のスペクトラ/ポア 6 (SPECTRUM LABORATORIES INC., CA, USA) を用いた。

【0067】

反応終了後の各翻訳反応液中のタンパク質の合成量は、GFP の蛍光量により測定した。GFP の蛍光量は、Turner Designs 社製の TD-360 Mini-Fluorometer を用い添付の手技に従って蛍光強度から定量した。これらの結果を図 1 に示す。

図1から明らかなように、翻訳鋳型を添加して凍結乾燥した場合（図中●）も、翻訳反応溶液を凍結乾燥せず、また翻訳鋳型も後から添加した場合（図中○）と変わらない合成活性を示し、反応時間が長くなってもその合成活性は高く保たれることがわかった。

【0068】

また、同様の実験で得られた翻訳反応溶液を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、ゲルをクマシーブリリアントブルーで染色した結果を図2に示す。図2A中で示したカラムが翻訳反応溶液を凍結乾燥せず、翻訳鋳型を後から添加した合成系による反応物を、また図2B中で示したカラムは翻訳鋳型を添加した翻訳反応溶液を凍結乾燥したものを用いた合成系による反応物を示す。図2B中から明らかなように、翻訳鋳型を添加した状態で凍結乾燥した翻訳反応溶液は、凍結乾燥しなかった翻訳反応溶液を用いた場合と同等のタンパク質合成活性を示した。

【実施例2】

【0069】

多クローンタンパク質の同時合成

実施例1と同様にして調製した翻訳反応溶液に、96種類の翻訳鋳型mRNAを各30 μ gずつ添加して、96ウェルのマイクロタイタープレートの各ウェルに50 μ lずつ分注した。これを実施例1と同様に凍結乾燥、保存した。得られた無細胞タンパク質合成用試薬が含まれる各ウェルに、それぞれ40～50 μ lの100mM酢酸カリウム溶液を分注し、これを溶解した。ここで、それぞれの溶液に14C-ロイシン（100mCi/mmol）を翻訳反応溶液1mlに対して4 μ Ci添加した。この溶液の上層にアミノ酸やエネルギー源や反応に必要なその他のイオン類等を含む基質・エネルギー供給液（以下、これを「供給液」と称する）として、30mM Hepes-KOH、pH7.6、95mM酢酸カリウム、2.65mM酢酸マグネシウム、2.85mMジチオスレイトール、1.2mM ATP、0.25mM GTP、16mMクレアチンリン酸、0.380mMスペルミジンと20種類のL-型アミノ酸（0.3mM）からなる溶液を界面を乱さないように重層した。

【0070】

これらを26℃で20時間反応し、反応終了後の溶液5 μ lをEndo, Y. et al., J. Biot. 25, 221-230(1992)、Endo, Y. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 559-564 (2000)に記載の方法によりオートラジオグラフィを行った。この結果を図3に示す。図から明らかなように、96種類の翻訳鋳型のほとんどが1枚のマイクロタイタープレートの各ウェル中で翻訳され、タンパク質が合成されていることがわかった。

【図面の簡単な説明】

【0071】

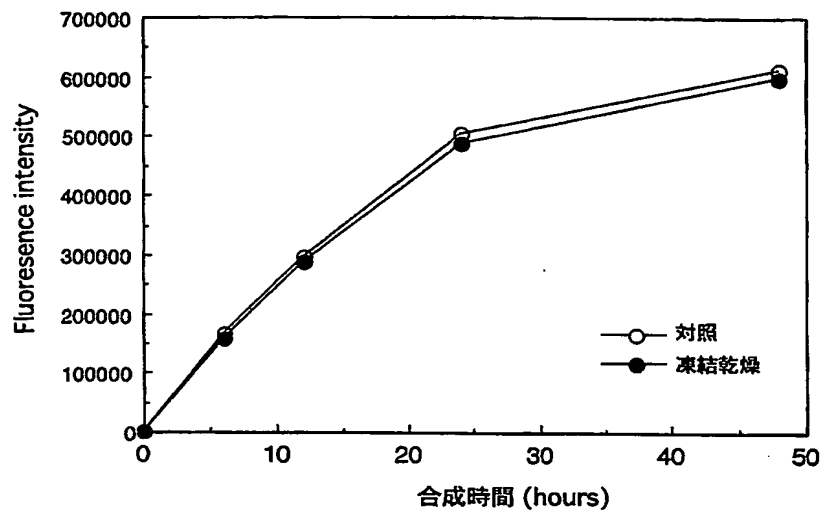
【図1】本発明の無細胞タンパク質合成用試薬を用いたGFPタンパク質合成量を示すグラフである。図中●：翻訳鋳型を添加して凍結乾燥した場合におけるGFPタンパク質合成量 図中○：翻訳反応溶液を凍結乾燥せず、また翻訳鋳型も後から添加した場合におけるGFPタンパク質合成量

【図2】本発明の無細胞タンパク質合成用試薬を用いた合成系において、SDS-PAGEによる翻訳反応溶液中に含まれるタンパク質を示す電気泳動写真である。A：翻訳反応溶液を凍結乾燥せず、また翻訳鋳型も後から添加した場合における反応物 B：翻訳鋳型を添加して凍結乾燥した場合における反応物

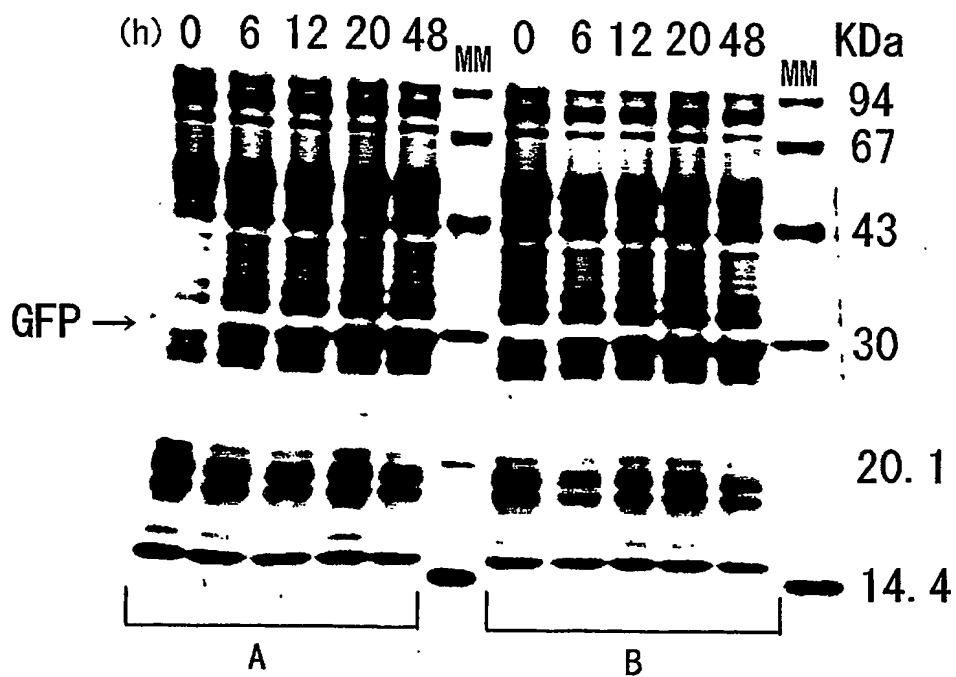
【図3】96種類の異なる翻訳鋳型を含む無細胞タンパク質合成用試薬を用いた合成系において、翻訳反応溶液中に含まれるタンパク質を示すオートラジオグラフィ図である。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【図3】



【書類名】要約書**【解決すべき課題】**

タンパク質チップ等を用いたハイスループット解析又は目的タンパク質を用いた検査における多検体での無細胞タンパク質合成に有利となるような簡便な操作によるタンパク質合成用試薬、およびそれを用いたタンパク質合成法を提供することを目的とする。さらに、上記試薬を用いたタンパク質ライブラリー、あるいはタンパク質チップの作製用キット、目的タンパク質の検査用キット等を提供すること。

【課題を解決するための手段】

無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有液にタンパク質合成に必要な物質、翻訳鋳型及び安定化剤を添加した翻訳反応溶液をマイクロタイタープレートのウェル内で凍結乾燥し、該ウェルに酢酸カルシウム溶液を添加して試薬を溶解した後に、無細胞タンパク質合成に用いられる基質、エネルギー源等を含む溶液を重層して翻訳反応を行わせたところ、マイクロタイタープレートの翻訳反応溶液中で目的のタンパク質が合成される。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 2 8 8 8 5 9
受付番号	5 0 3 0 1 3 1 2 8 4 9
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 5 年 8 月 8 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成15年 8月 7日

特願 2 0 0 3 - 2 8 8 8 5 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 9 4 0 1 6 1 8 2]

1. 変更年月日	2 0 0 0 年 5 月 1 5 日
[変更理由]	住所変更
住 所	愛媛県松山市久万ノ台 4 7 8 - 1 7
氏 名	遠藤 弥重太

特願 2 0 0 3 - 2 8 8 8 5 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 3 0 5 6 6 4 3]

1. 変更年月日
[変更理由]
住 所
氏 名

2 0 0 3 年 2 月 1 0 日
新規登録
愛媛県松山市本町 3 - 1 - 8 - 7 0 1
澤崎 達也

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.